

УДК 577.152.344:577.15.072

К. А. Філіпцова, І. Л. Вовчук
ОДЕСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ І. І. МЕЧНИКОВА

ФІЗИКО-ХІМІЧНІ ВЛАСТИВОСТІ КАРБОКСИПЕПТИДАЗИ А ЗЛОЯКІСНОГО НОВОУТВОРЕННЯ МОЛОЧНОЇ ЗАЛОЗИ

Досліджено фізико-хімічні властивості карбоксипептидази А (КА) злоякісного новоутворення молочної залози. Молекулярна маса КА становила 42 601 Да. Температурний оптимум КА встановлено при 37 °С, оптимум рН – у ділянці рН від 5,0 до 5,5. Негативний вплив іонів двовалентних металів на активність КА знижується в ряді $Cu > Cd > Ca > Mg > Co > Pb > Mn > Ba > Zn = Hg > Ni > Fe$. За дією більшості досліджуваних металів і температурною залежністю карбоксипептидази А злоякісного новоутворення молочної залози подібна, а за молекулярною масою, оптимумом рН та дією таких іонів, як Zn^{++} і Ca^{++} , відрізняється від карбоксипептидази А з інших біологічних об'єктів.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: карбоксипептидаза А, молочна залоза, фізико-хімічні властивості.

ВСТУП. Культури пухлинних і трансформованих клітин молочної залози, за літературними даними, містять підвищену кількість різних протеолітичних ферментів, роль яких у процесах канцерогенезу на сьогодні мало досліджено, адже протеази не тільки беруть участь у різних етапах багатоступінчастого процесу канцерогенезу, але й втягнуті в складний ланцюг взаємозв'язків ракової клітини із сусідніми нормальними тканинами і різними регуляторними та захисними системами організму [1, 2, 8, 9].

Одні дослідники вважають, що карбоксипептидаза А індукує диференціацію проліферативних клітин [24], диференціацію мукозних клітин у серозні [12], інші – вказують на зв'язок між карбоксипептидазою А і процесами малігнізації [31] та інвазії [14, 28].

Метою роботи було дослідити фізико-хімічні властивості карбоксипептидази А злоякісного новоутворення молочної залози.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Матеріалом для дослідження були резектовані зразки злоякісного новоутворення молочної залози жінок, які не отримували медикаментозного дооперативного лікування. Патоморфологічний діагноз – помірно диференційована форма інфільтруючого протокового раку молочної залози – було верифіковано за Міжнародною класифікацією ВООЗ із визначенням морфологічного стану пухлинної тканини [5]. Згідно

з договором про сумісні дослідження, обласний онкологічний диспансер м. Одеси надав матеріал для дослідження та провів гістологічну верифікацію.

З гомогенату зразків, за допомогою поетапного фракціонування $(NH_4)_2SO_4$ [7], діалізу за присутності 2 мМ Zn^{++} [7] та гель-хроматографії і сефадексу – G 75 ("Pharmacia", Швеція) [7], було отримано пептидазу, яка гідролізувала специфічний для карбоксипептидази А синтетичний субстрат – карбобензоксиглутамілфеніланін [29]. Активність карбоксипептидази А злоякісного новоутворення молочної залози визначали по гідролізу 2,0 мМ синтетичного субстрату карбобензоксиглутамілфеніланіну за методом Bradshaw [29].

Молекулярну масу карбоксипептидази А злоякісного новоутворення молочної залози визначали з використанням маркерних білків з відомою молекулярною масою: білок сироватки крові людини – 66 500 Да, овальбумін – 43 000 Да, хімотрипсиноген А – 25 000 Да, лізоцим – 17 500 Да та РНК-аза – 13 700 Да за методом Ендрюса [7].

Температурний оптимум карбоксипептидази А злоякісного новоутворення молочної залози визначали по гідролізу 2,0 мМ розчину карбобензоксиглутамілфеніланіну за 30-хвилинної інкубації ферменту при температурі від 20 до 60 °С. За 100 % (контроль) було взято найвищі показники каталітичної активності ферменту, що були встановлені при температурі 37 °С.

© К. А. Філіпцова, І. Л. Вовчук, 2012.

ОРИГІНАЛЬНІ ДОСЛІДЖЕННЯ

Оптимум рН карбоксипептидази А злякислого новоутворення молочної залози визначали по гідролізу 2,0 мМ розчину карбобензоксиглутамілфенілаланіну при 37 °С з використанням стандартних буферних розчинів з рН 3,0, 4,0, 5,2, 7,4 та 9,0. За 100 % (контроль) було взято максимальну активність ферменту, отриману при рН 5,2 і температурі 37 °С.

Вплив металів на активність карбоксипептидази А злякислого новоутворення молочної залози визначали при інкубації ферменту за присутності 0,05 мМ розчинів іонів двовалентних металів: ртуті (Hg^{++}), заліза (Fe^{++}), нікелю (Ni^{++}), барію (Ba^{++}), магнію (Mg^{++}), кадмію (Cd^{++}), міді (Cu^{++}), кобальту (Co^{++}), кальцію (Ca^{++}), свинцю (Pb^{++}), марганцю (Mn^{++}), цинку (Zn^{++}) при температурі 37 °С. За 100 % (контроль) було взято активність карбоксипептидази А, отриману при інкубації ферменту без додавання іонів двовалентних металів.

Результати дослідження оброблено статистично з визначенням коефіцієнта Стюдента [8].

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. Молекулярна маса карбоксипептидази А, яку було отримано з тканини злякислого новоутворення молочної залози, становила 42 601 Да (рис. 1).

Відповідно до літературних даних, карбоксипептидаза А злякислого новоутворення молочної залози відрізнялася за молекулярною масою від карбоксипептидази А з інших біологічних об'єктів. Виділений фермент мав більшу молекулярну масу, ніж карбоксипептидаза А підшлункової залози людини і ссавців [26]; підшлункової залози великої рогатої худоби [6]; епідермальних клітин дводенних щурів [23]; морського кільчастого черв'яка [11]; легень людини [19]; кісткового мозку мишей

[10]; мозку людини [22]; немалігнізованої тканини яєчників і доброякісного та злякислого новоутворень яєчників людини [4]. Карбоксипептидаза А злякислого новоутворення молочної залози мала меншу молекулярну масу, ніж карбоксипептидаза А концентрованої сечі людини [27] і мононуклеарних клітин периферичної крові людини [15].

Залежність активності карбоксипептидази А злякислого новоутворення молочної залози від температури описували типовою куполоподібною кривою, а найвищі показники каталітичної активності було встановлено при температурі 37 °С, що збігається з температурним оптимумом карбоксипептидази А концентрованої сечі людини [27], карбоксипептидаза А-подібного ферменту нирок щурів [21], водоемульсійної моделі карбоксипептидази А [30] (рис. 2).

Встановлено, що при зменшенні температури нижче встановленого температурного оптимуму (37 °С) активність карбоксипептидази А була нижчою, порівняно з контролем, на 15,0 % при 30 °С та на 36,0 % при 20 °С. Збільшення температури вище встановленого температурного оптимуму (37 °С) призводило до зниження активності карбоксипептидази А злякислого новоутворення молочної залози: на 23,0 % при 40 °С, на 36,0 % при 50 °С та на 45,0 % при 60 °С порівняно з контролем (рис. 2). Втрата активності карбоксипептидази А при зміні температурних умов середовища може бути викликана денатурацією білкової частини ферменту, втратою металу [3, 20, 30].

Оптимум рН карбоксипептидази А тканини злякислого новоутворення молочної залози було виявлено в ділянці рН від 5,0 до 5,5, а крива, яка описує залежність активності ферменту від рН середовища, мала куполоподібну форму (рис. 3).

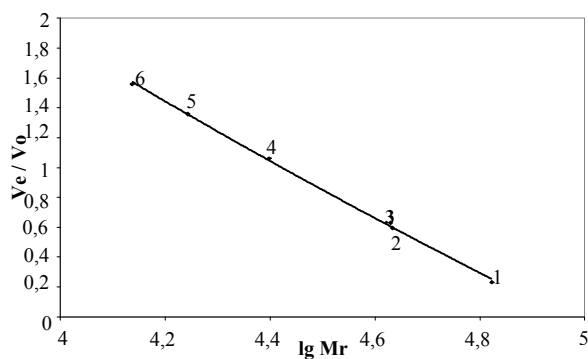


Рис. 1. Молекулярна маса карбоксипептидази А злякислого новоутворення молочної залози (n=3).

Примітка: 1 – альбумін сироватки крові людини (66 500 Да); 2 – овальбумін (43 000 Да); 3 – карбоксипептидаза А злякислого новоутворення молочної залози (42 601 Да); 4 – хімотрипсिन (25 000 Да); 5 – лізоцим (17 500 Да); 6 – РНК-аза (13 700 Да).

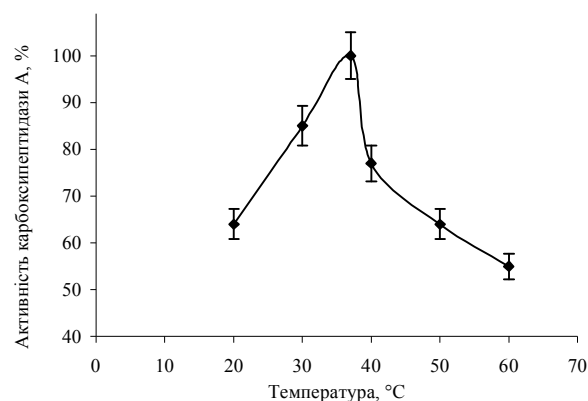


Рис. 2. Вплив температури на активність карбоксипептидази А тканини злякислого новоутворення молочної залози (n=3).

Примітка: контроль – за 100 % було взято активність карбоксипептидази А, отриману при 37 °С.

Отримані результати вивчення оптимуму рН карбоксипептидази А злякисного новоутворення молочної залози відрізняються від літературних даних щодо рН-залежності карбоксипептидази А підшлункової залози бика [6] карбоксипептидази А-подібного ферменту епідермальних клітин дводенних шурів [23], карбоксипептидази А-подібного ферменту нирок шурів [22], карбоксипептидази А концентрованої сечі людини [28], оптимум рН яких перебуває в ділянці рН від 6,0 до 8,5.

Підвищення (рН 4,0 і 3,0) або зниження (рН 7,4 і 9,0) концентрації іонів водню (H^+) в середовищі призводило до зменшення активності карбоксипептидази А злякисного новоутворення молочної залози, порівняно з контролем, на 52,0 і 64,0 % в умовах кислого середовища та на 42,0 і 60,0 % в умовах лужного середовища (рис. 3).

Отримані результати свідчать про те, що в умовах кислого середовища інактивація карбоксипептидази А тканини злякисного новоутворення молочної залози відбувається швидше, ніж у лужному середовищі, що збігається з результатами Skidgel, Davis і Erdos [27], які встановили втрату активності від 60,0 % і більше для карбоксипептидази А концентрованої сечі людини при закисленні рН середовища.

За результатами дослідження впливу іонів двовалентних металів на активність карбоксипептидази А тканини злякисного новоутворення молочної залози було встановлено, що інкубація ферменту з розчинами всіх досліджуваних металів призводила до зниження активності карбоксипептидази А порівняно з контролем, а їх негативний вплив змінювався в ряді: $Cu > Cd > Ca > Mg > Co > Pb > Mn > Ba > Zn = Hg > Ni > Fe$ (рис. 4).

Найменший негативний вплив для карбоксипептидази А злякисного новоутворення молочної залози спостерігався при інкубації

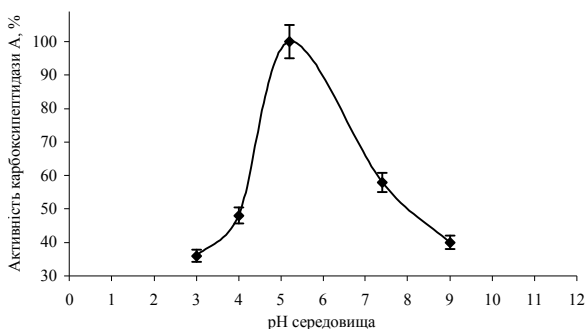


Рис. 3. Вплив рН середовища на активність карбоксипептидази А тканини злякисного новоутворення молочної залози (n=3).

Примітка: контроль – за 100 % було взято активність карбоксипептидази А, отриману при рН 5,2 і температурі 37 °С.

ферменту з іонами Fe^{++} . Зниження активності ферменту, порівняно з контролем, було незначним – 9,0 %. Присутність в інкубаційному середовищі іонів Ni^{++} , Zn^{++} , Hg^{++} , Ba^{++} , Mn^{++} і Pb^{++} призводила до втрати від 25,0 до 35,0 % активності досліджуваного ферменту порівняно з контролем (рис. 4).

При інкубації карбоксипептидази А злякисного новоутворення молочної залози з Co^{++} або Mg^{++} було встановлено значне, порівняно з контролем, зниження активності ферменту – на 49,0 і 50,0 %. Та найбільший негативний вплив іонів металів спостерігався при дії Ca^{++} , Cd^{++} та Cu^{++} – втрата активності карбоксипептидази А становила майже 80,0 – 90,0 %, що частково збігається з результатами досліджень інших авторів [11, 16, 25] (рис. 4).

Отримані результати дослідження впливу іонів двовалентних металів збігаються з даними літератури, які свідчать про негативну дію більшості з них, що можна пояснити абсорбцією металу на поверхні молекули ферменту, що приводить до зміни просторової конформації [11, 13, 17, 20]. Однак результати впливу таких металів, як Ca^{++} і Zn^{++} , що є активаторами карбоксипептидази А, виділеної з інших біологічних об'єктів, відрізняються від літературних даних щодо їх позитивного впливу, який сприяє стабілізації структури карбоксипептидази А [4, 11, 17, 18, 20].

Одержані результати свідчать про те, що за дією більшості досліджуваних металів і температурною залежністю карбоксипептидази А тканини подібна до карбоксипептидази А інших біологічних об'єктів, однак відрізняється за молекулярною масою, оптимумом рН та дією таких іонів, як Ca^{++} і Zn^{++} , які знижували пептидазну активність ферменту.

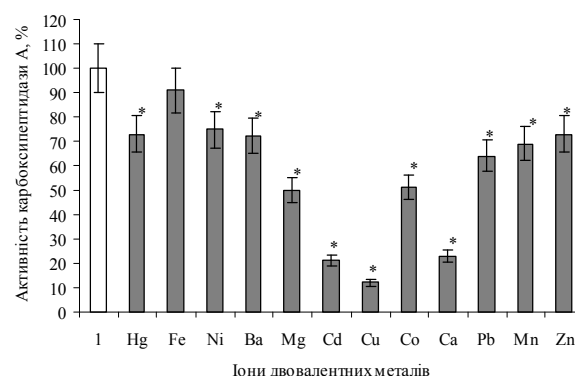


Рис. 4. Вплив іонів двовалентних металів на активність карбоксипептидази А тканини злякисного новоутворення молочної залози (n=3).

Примітка: 1 – контроль – за 100 % було взято активність карбоксипептидази А без додавання іонів двовалентних металів; * – вірогідне зниження активності карбоксипептидази А відносно контролю ($p < 0,05$).

ВИСНОВКИ. 1. Молекулярна маса карбоксипептидази А злоякісного новоутворення молочної залози становить 42 601 Да.

2. Температурний оптимум карбоксипептидази А злоякісного новоутворення молочної залози встановлено при 37 °С.

3. Оптимум pH карбоксипептидази А злоякісного новоутворення молочної залози встановлено в ділянці pH від 5,0 до 5,5.

4. Активність карбоксипептидази А злоякісного новоутворення молочної залози знижується за присутності $\text{Cu} > \text{Cd} > \text{Ca} > \text{Mg} > \text{Co} > \text{Pb} > \text{Mn} > \text{Ba} > \text{Zn} = \text{Hg} > \text{Ni} > \text{Fe}$.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

- Веремеєнко К. Н. Протеолитические ферменты и их ингибиторы. Новые области применения в клинике / К. Н. Веремеєнко // Врач. дело. – 1994. – № 1. – С. 8–13.
- Веремеєнко К. Н. Роль протеолиза в инвазии и метастазировании злокачественных опухолей / К. Н. Веремеєнко, Д. И. Зоболотный, А. И. Кизим // Журн. АМН Украины. – 1987. – **8**, № 2. – С. 217–237.
- Виноградова Р. П. Молекулярные основы действия ферментов / Р. П. Виноградова. – К.: Вища школа, 1978. – 260 с.
- Вовчук И. Л. Физико-химические свойства карбоксипептидазы А, выделенной из немалигнизированной и опухолевой тканей яичника женщин / И. Л. Вовчук, С. А. Петров // Материали IX Українського біохімічного з'їзду (24–27 жовтня 2006 р.). – Харків: Харківський нац. ун-т ім. В. Н. Каразіна, 2006. – С. 35.
- Всемирная Организация Здравоохранения // Материали ежегодных отчетов. – СПб., 1981. – 286 с.
- Неорганическая биохимия / под ред. Г. Эйхгорна. – М.: Мир, 1978. – Т. 1. – С. 504–560.
- Практическая химия белка. – М.: Мир, 1989. – С. 39–43.
- Рокицкий П. Ф. Биологическая статистика / П. Ф. Рокицкий. – Минск: Высш. Школа, 1967. – 326 с.
- Тарутинов В. И. Рак молочной железы / В. И. Тарутинов // Лікування та діагностика. – 1998. – № 2. – С. 22.
- Altered storage of proteases in mast cells from mice lacking heparin: a possible role for heparin in carboxypeptidase A processing / F. Henningsson, J. Leddin, C. Lunderius [et al.] // Biol. Chem. – 2002. – **383**, № 5. – P. 793–801.
- A novel metallocarboxypeptidase-like enzyme from the marine annelid *Sabellastarte magnifica*—a step into the invertebrate world of proteases / M. Alonso-del-Rivero, S. A. Trejo, M. Rodriguez de la Vega [et al.] // FEBS J. – 2009. – **276**, № 17. – P. 4875–4890.
- Carboxypeptidase A in mouse mast cells. Identification, characterization and use as a differentiation marker / W. E. Serafin, E. T. Dayton, P. M. Gravalles [et al.] // J. Immunol. – 1987. – **139**, № 11. – P. 3771–3776.
- Carboxypeptidase A: native, zinc-removed and mercury-replaced forms / H. M. Greenblatt, H. Feinberg, P. A. Tucker, G. Shoham // Acta. Crystallogr. D. Biol. Crystallogr. – 1998. – **54**, № 3. – P. 289–305.
- Carboxypeptidase 4 gene variants and early-onset intermediate-to-high risk prostate cancer / P. L. Ross, I. Cheng, X. Liu [et al.] // BMC Cancer. – 2009. – **9**. – P. 69.
- Cathepsin A is the major hydrolase catalyzing the intracellular hydrolysis of the antiretroviral nucleotide phosphonoamidate prodrugs GS-7340 and GS-9131 / G. Birkus, R. Wang, X. Liu [et al.] // Antimicrob Agents Chemother. – 2007. – **51**, № 2. – P. 543–550.
- Changes in carboxypeptidase A, dipeptidase and Na^+/K^+ ATPase activities in the intestine of rats orally exposed to different doses of cadmium / G. E. Eriyaremu, S. O. Asagba, E. C. Onyeneke, M. A. Adaikpoh // Biometals. – 2005. – **18**, № 1. – P. 1–6.
- Funakoshi T. Effect of nickel on enzymatic activities in the mouse pancreas / T. Funakoshi, K. Kuromatsu, S. Kojima // Res. Commun. Mol. Pathol. Pharmacol. – 1996. – **92**, № 2. – P. 245–252.
- Hedemann M. S. Influence of dietary zinc and copper on digestive enzyme activity and intestinal morphology in weaned pigs / M. S. Hedemann, B. B. Jensen, H. D. Poulsen // J. Anim. Sci. – 2006. – **84**, № 12. – P. 3310–3320.
- Human mast cell carboxypeptidase. Purification and characterization / S. M. Goldstein, C. E. Kaempfer, J. T. Kealey, B. U. Wintroub // J. Clin. Invest. – 1989. – **83**, № 5. – P. 1630–1636.
- Li X. Zinc-mediated thermal stabilization of carboxypeptidase A / X. Li, B. Solomon // Biomol. Eng. – 2001. – **18**, № 4. – P. 179–183.
- Localization of carboxypeptidase A-like enzyme in rat kidney / R. Igic, S. Garber, M. Sekosan [et al.] // Peptides. – 2003. – **24**, № 8. – P. 1237–1240.
- Lyons P. J. Characterization of carboxypeptidase A6, an extracellular matrix peptidase / P. J. Lyons, M. B. Callaway, L. D. Fricker // J. Biol. Chem. – 2008. – **283**, № 11. – P. 7054–7063.
- Purification and characterization of carboxypeptidase from terminally differentiated rat epidermal cell / M. Kikuchi, K. Fukuyama, K. Hirayama, W. Epstein // Biochim. Biophys. Acta. – 1989. – **991**, № 1. – P. 19–24.
- Scher W. Proteases act synergistically with low molecular weight inducers to stimulate mouse erythroleukemia cell differentiation / W. Scher, B. W. Scher, S. Waxman // Exp. Hematol. – 1983. – **6**, № 11. – P. 490–498.
- Shimada H. Acute, nontoxic cadmium exposure inhibits pancreatic protease activities in the mouse / H. Shimada, T. Funakoshi, M. P. Waalkes // Toxicol Sci. – 2000. – **53**, № 2. – P. 474–480.
- Single-step isolation and resolution of pancreatic carboxypeptidase A and B / T. J. Bazzzone, M. Sokolovsky, L. B. Cueni, B. L. Vallee // Biochem. – 1979. – **18**, № 20. – P. 4362–4366.
- Skidgel R. A. Purification of a human urinary carboxypeptidase distinct from carboxypeptidases A, B

or N / R. A. Skidgel, R. M. Davis, E. G. Erdos // Anal. Biochem. – 1984. – **140**, № 2. – P. 520–531.

28. Tanco S. Characterization of the substrate specificity of human carboxypeptidase A4 and implications for a role in extracellular peptide processing / S. Tanco, X. Zhang, C. Morano [et al.] // J. Biol. Chem. – 2010. – **285**, № 24. – P. 18385–18396.

29. The amino acid sequence of bovine carboxypeptidase A / R. S. Bradshaw, L. H. Ericsson, K. A. Walsh,

H. Neurath // Proc. Natl. Acad. Sci USA. – 1969. – **63**. – P. 1389–1394.

30. Thompson J. S. Structure and function of carboxypeptidase A alpha in supercooled water / J. S. Thompson, H. Gehring, B. L. Vallee // Proc. Natl. Acad. Sci U.S.A. – 1980. – **77**, № 1. – P. 132–136.

31. Vovchuk I. L. Estrogens, trypsin-like proteinases and carboxypeptidases A and B at womb body tumors / I. L. Vovchuk, S. S. Chernadchuk, S. A. Petrov // Biomed Khim. – 2007. – **53**, № 2. – P. 205–211.

Е. А. Филиппова, И. Л. Вовчук

ОДЕССКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ И. И. МЕЧНИКОВА

ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА КАРБОКСИПЕПТИДАЗЫ А ЗЛОКАЧЕСТВЕННОГО НОВООБРАЗОВАНИЯ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Резюме

Исследовано физико-химические свойства карбоксипептидазы А (КА) злокачественного новообразования молочной железы. Молекулярная масса КА составляла 42 601 Да. Температурный оптимум КА установлен при 37 °С, оптимум pH – в области pH от 5,0 до 5,5. Негативное влияние ионов двувалентных металлов на активность КА снижается в ряде Cu>Cd>Ca>Mg>Co>Pb>Mn>Ba>Zn=Hg>Ni>Fe. По действию большинства исследуемых металлов и температурной зависимости карбоксипептидаза А злокачественного новообразования молочной железы сходна, а по молекулярной массе, оптимуму pH и действию таких ионов, как Zn²⁺ и Ca²⁺, отличается от карбоксипептидазы А с других биологических объектов.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: карбоксипептидаза А, молочная железа, физико-химические свойства.

К. А. Filiptsova, I. L. Vovchuk

I. I. MECHNYKOV ODESSA NATIONAL UNIVERSITY

PHYSICOCHEMICAL PROPERTIES OF CARBOXYPEPTIDASE A OF THE MALIGNANT TUMOR TISSUE OF THE MAMMALIAN GLAND

Summary

Physicochemical properties of carboxypeptidase A (CA) of the malignant tumor tissue of mammalian gland were studied. Molecular mass of this CA is 42 601 Da. Optimum of temperature of this CA is presented at 37 °C, optimum pH – in region of the pH 5,0–5,5. The negative influence of bivalent metal ions on the activity of this CA is reduced in series: Cu>Cd>Ca>Mg>Co>Pb>Mn>Ba>Zn=Hg>Ni>Fe. By the influence majority of bivalent metal ions and optimum of temperature this carboxypeptidase A of the malignant tumor tissue of mammalian gland is not differentiation, and by the molecular mass, optimum pH and influence of this metal ions, as the Zn²⁺ and Ca²⁺, – is differentiation of the carboxypeptidase A from the other of biological objects.

KEY WORDS: carboxypeptidase A, mammalian gland, physicochemical properties.

Отримано 05.01.12

Адреса для листування: К. А. Філіппова, Одеський національний університет імені І. І. Мечникова, пров. Шампанський, 2, Одеса, 65058, Україна, e-mail: kafil-bio@mail.ru